昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, March 2010, 53(3): 248 – 256　　ISSN 0454-6296

中国意大利蜜蜂微卫星遗传多态性

赵亚周，彭文君*，安建东，胡长安，国占宝
（中国农业科学院蜜蜂研究所，农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室，北京 100093）

摘要：为了分析我国不同生态条件下意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*（简称意蜂）的基因特征，对品种间基因交流或基因渗入现象进行监测，完成对我国主要地区意蜂多样性水平的评价。本研究利用 10 对微卫星（SSR）引物分析了来自我国黑龙江等 14 个省市自治区 31 个采集点的意蜂样品的遗传多态性，并与来自德国的喀尼阿兰蜂 *A. m. carnica*（简称喀蜂）和来自美国的意蜂 *A. m. ligustica* 进行比对。通过 NTSYS-pc2.1 和 popGene32 软件对 SSR 数据进行多态性分析。结果表明：10 对 SSR 引物中 8 对表现出较高的遗传稳定性，可作为意蜂遗传多态性标记。遗传一致度在 0.61 以上时，浙江、四川、甘肃和云南地区的样品出现较严重分化，其他地区的意蜂样品则保持了美国原种意蜂的典型基因特征。东北和新疆地区的样品与德国喀蜂血统亲缘关系较近（遗传距离在 0.18149 以内），分析主要原因可能是该地区的意蜂样品杂有黑蜂 *A. m. mellifera* 血统。据此提出应在保护各地意蜂原种特性及种群多态性的基础上，科学有效地进行高产品种的繁育。

关键词：意大利蜜蜂；喀尼阿兰蜂；遗传多态性；微卫星标记；NTSYS；popGene
中图分类号：S893.3　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)03-0248-09

Microsatellite DNA polymorphism of the Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*, in China

ZHAO Ya-Zhou, PENG Wen-Jun*, AN Jian-Dong, HU Chang-An, GUO Zhan-Bao (Key Laboratory for Insect-Pollinator Biology of the Ministry of Agriculture, Institute of Apiculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: To detect the gene flow and gene introgression among different populations, and to evaluate the diversity of Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*, from different regions in China, the genetic variability of *A. m. ligustica* was screened in 34 sites from 16 provinces in China where the beekeeping was flourishing with ten polymorphic microsatellite loci. Samples of *A. m. carnica* from Germany and *A. m. ligustica* from the USA were genotyped for comparison. The SSR data were analyzed with the software of NTSYS-pc2.1 and popGene32. The results showed that eight of the ten polymorphic microsatellite loci were useful markers to detect the polymorphism of *A. m. ligustica*. When Nei's genetic identity index exceeded 0.61, distinct genetic divergence was found in the samples from Zhejiang, Sichuan, Gansu and Yunnan, while other samples still kept unique genetic characteristics typical in the subspecies *A. m. ligustica*. The samples from northeast of China and Xinjiang region had a close descent relationship with *A. m. carnica* (the genetic distances between them were all below 0.18149), which might result from the hybridization with *A. m. mellifera* to some extent. It is so proposed that the characteristics typical of *A. m. ligustica* and its genetic variability should be protected and the breeding line should be in line with a scientific criterion.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; *Apis mellifera carnica*; DNA polymorphism; microsatellite; NTSYS; popGene

---

基金项目：引进国际先进农业科学技术项目(2006-G19)；国家蜜蜂产业技术体系建设专项
作者简介：赵亚周，男，1984 年生，河北保定人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂种质资源与遗传育种，E-mail：zhaoyazhou0301@hotmail.com
*通讯作者 Corresponding author，E-mail：pengwenjun@vip.sina.com
收稿日期 Received：2009-10-29；接受日期 Accepted：2010-01-31

前人对蜜蜂遗传多态性，尤其是对西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 的系统发育、起源以及分类等方面的研究已经较为深入。Ruttner 等(1978)就提出了一系列经典的形态学指标(36 个)用于研究西方蜜蜂的遗传多态性，经过多年的努力到 1988 年时，他们将欧洲的 24 个西方蜜蜂亚种主要分为 4 个分支(A 代表非洲分支；M 代表北地中海分支；C 代表西欧分支；O 代表近东类型)(Ruttner *et al.*,1988)。同时这些地理类型得到了线粒体 DNA 标记(Cornuet *et al.*, 1991；Garnery *et al.*, 1993, 1995)和核 DNA 标记(Estoup *et al.*, 1993, 1995)的验证，但是分子生物学方面的研究结果与 Ruttner 的形态学研究结果存在一定出入，如线粒体 C 分支上包含形态学的 C 分支和部分 O 分支。说明形态学研究与分子生物学研究之间存在一定的差异，可能是由二者之间的进化速度差异所造成(Susnik *et al.*, 2004)。由于基因是遗传信息的载体，决定着生物的表型特征，因此利用现代分子技术能够更加高效、准确地检测蜜蜂遗传多态性现状。

我国幅员辽阔，地形多样，存在较多的自然屏障，使得我国生物资源丰富，存在大量的地理亚种或生态型(季维智和宿兵，1996)。自从 1896 年起，以意蜂为主的西方蜜蜂逐渐引入我国，其优越的生产性能，得到了广大养蜂人和育种专家的认可，使得其被大范围地饲养传播，并迅速取代中华蜜蜂，成为目前我国养蜂生产中的主要蜂种(杨冠煌，2005)。经过近一个世纪的繁衍进化，我国的意蜂已逐步适应各地特殊的生态环境，衍生出大量的生态型(余林生等，2008)。迄今为止，针对这些地理群体或生态型的研究报道主要是在蜜蜂饲养集中的地区进行意蜂遗传多态性研究(陈盛禄等，2005；吴黎明等，2005；吉挺等，2007)，而对养蜂业欠发达和生态条件较闭塞山区的意蜂种群多态性鲜有报道。我国对不同地区意蜂品种评价及定名混乱，比如澳意、美意、原意或者本意仅仅是以意大利蜜蜂的来源地定名，很少有对其血统情况进行溯源分析(吉挺等，2003；孙亮先等，2004；孙亮先等，2004；姜双林等，2007)；并且相同地区意蜂品种名目繁多，部分地区在进行意蜂品种繁育和引进过程中仅是根据蜂种是否高产，很少考虑到优良血统的保护和生物恶性竞争的潜在威胁(余林生等，2003；季荣等，2003；王凤鹤等，2007；杨冠煌，2009)。针对以上现状，本研究目的在于分析不同生态条件下(或地理范围内)意蜂的基因特征，对品种间基因交流或基因渗入现象进行监测，完成对我国主要地区意蜂多样性水平的评价。本实验在设计过程中，综合考虑了样品的来源情况，包括地理环境、蜂群饲养的定转地情况、人工引种历史记录等对样品遗传多态性的影响，尽可能地保持样品的地区代表性，并采用目前研究种群多态性比较经典的 SSR 技术对这些样品进行系统检测。

1　材料与方法

1.1　样品采集整理

本实验样品主要来自地理隔离条件较好且定地饲养达 4 年以上的蜂场，或者专门进行蜂王保种或育种的蜂场。为了使实验数据具有一定的统计学意义，每个地点随机选定 1 ~ 2 个蜂群，每个蜂群采取 3 ~ 4 头工蜂立即浸入酒精杀死，－20℃保存待用。从 2007 和 2008 两年的时间，从全国黑龙江等 16 个省市自治区 34 个点采集到 50 群意蜂或喀蜂，共计 157 份实验样品(表 1)。

1.2　基因组微卫星(SSR)扩增研究

DNA 基因组提取参照 Ball 和 Armstrong(2008)提出的优化方案，DNA 样品提取后经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测提取质量。

本研究采用相关文献报道(Solignac *et al.*, 2003, 2004)或 NCBI 检索，最终获得 10 对多态性较好的 SSR 引物(表 2)，实验发现其中 8 对 SSR 引物(A107, A113, A7, A14, A76, A88, Ap274 和 A35)多态性稳定。经 PCR 扩增体系和扩增条件优化后，对 DNA 样品进行扩增，PCR 产物由 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行初检以保证扩增效率。

PCR 产物经高温变性得到单链状态，采用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶(Arc∶Bis = 19∶1)垂直电泳依照片段大小对 PCR 产物进行分离，最后经硝酸银染色方法显色，并判断其基因型。

对聚丙烯酰胺凝胶图谱上每个样品的扩增条带进行基因型判断，在相同的迁移率位置上，有带赋值为 1，无带赋值为 0，形成 0，1 数据矩阵。再利用可对 0，1 矩阵进行分析的软件 NTSYS-pc2.1 和 popGene32 软件进行遗传多态性评价。

表1 实验样品采集信息

Table 1 The sampling information

蜂群代码 Sample code	亚种名 Subspecies	采集地点 Collecting sites	经纬度 Latitude and longitude	蜂群数量 Number of colonies
HH	*Apis mellifera ligustica*	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	46.1657°N, 126.6883°E	2
JC	*A. m. ligustica*	吉林长白山 Changbaishan, Jinin	42.0463°N, 127.7858°E	2
LXM	*A. m. ligustica*	辽宁兴城市 Xingcheng, Liaoning	40.6334°N, 120.6723 °E	2
HX	*A. m. ligustica*	河北兴隆县 Xinglong, Hebei	40.4184°N, 117.4987°E	2
DK	*A. m. carnica*	北京(引自德国)Beijing (introduced from Germany)	40.0059°N, 116.1994°E	1
MK	*A. m. carnica*	北京(引自美国)Beijing (introduced from the USA)	40.0059°N, 116.1994°E	1
MY	*A. m. ligustica*	北京(引自美国)Beijing (introduced from the USA)	40.0059°N, 116.1994°E	1
SZL	*A. m. ligustica*	山东淄博市 Zibo, Shandong	36.8019°N, 117.8649°E	2
SYZ	*A. m. ligustica*	陕西榆林市 Yulin, Shaanxi	38.3524°N, 109.7328°E	2
GS1	*A. m. ligustica*	甘肃天水市 Tianshui, Gansu	34.5604°N, 105.7122N°E	1
GS1	*A. m. ligustica*	甘肃天水市 Tianshui, Gansu	34.5604°N, 105.7122°E	1
GS1	*A. m. ligustica*	甘肃天水市 Tianshui, Gansu	34.5654°N, 105.7235°E	1
GS1	*A. m. ligustica*	甘肃天水市 Tianshui, Gansu	34.5654°N, 105.7235°E	1
GS2	*A. m. ligustica*	甘肃西和县 Xihe, Gansu	34.0156°N, 105.3012°E	2
NHH	*A. m. ligustica*	宁夏海原县 Haiyuan, Ningxia	36.5632°N, 105.6518°E	2
XWF	*A. m. ligustica*	新疆乌鲁木齐市 Urumchi, Xinjiang	43.8882°N, 87.5606°E	2
HCW	*A. m. ligustica*	湖南常德市武陵区 Changde, Hunan	29.0054°N, 111.6744°E	2
HW	*A. m. ligustica*	湖南武冈市 Wugang, Hunan	26.7258°N, 110.6438°E	2
HSF1	*A. m. ligustica*	湖北十堰房县 Shiyanfang, Hubei	32.063°N, 110.7418°E	1
HSF2	*A. m. ligustica*	湖北十堰房县 Shiyanfang, Hubei	32.0561°N, 110.7418°E	1
HSF3	*A. m. ligustica*	湖北十堰房县 Shiyanfang, Hubei	32.0561°N, 110.7418°E	2
HXQ	*A. m. ligustica*	湖北襄樊市 Xiangfan, Hubei	32.0211°N, 112.018°E	2
HWJ	*A. m. ligustica*	湖北武汉市 Wuhan, Hubei	30.3762°N, 114.4202°E	2
ZJ1	*A. m. ligustica*	浙江丽水缙云县 Lishui, Zhejiang	28.6491°N, 120.0679°E	1
ZJ2	*A. m. ligustica*	浙江杭州市 Hangzhou, Zhejiang	30.2709°N, 120.8675°E	2
ZJ3	*A. m. ligustica*	浙江江山市 Jiangshan, Zhejiang	28.7352°N, 118.6423°E	1
ZJ4	*A. m. ligustica*	浙江慈溪市 Cixi, Zhejiang	30.1793°N, 121.2623°E	1
ZJ5	*A. m. ligustica*	浙江平湖市 Pinghu, Zhejiang	30.6999°N, 121.0186°E	1
SC1	*A. m. ligustica*	四川广汉县 Guanghan, Zhejiang	30.9799°N, 104.2687°E	1
SC2	*A. m. ligustica*	四川绵阳市 Mianyang, Sichuan	31.4651°N, 104.7417°E	1
SC3	*A. m. ligustica*	重庆武隆县 Wulong, Chongqing	29.3258°N, 107.7557°E	1
YN1	*A. m. ligustica*	云南蒙自市 Mengzi, Yunnan	23.3652°N, 103.4102°E	2
YN2	*A. m. ligustica*	云南昆明市 Kunming, Yunnan	25.129°N, 102.7471°E	1
YN3	*A. m. ligustica*	云南昆明市 Kunming, Yunnan	25.129°N, 102.7471°E	1

表 2　10 对微卫星座位信息及其 PCR 扩增条件

Table 2　Ten microsatellite loci and the PCR amplification conditions

微卫星座位 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession no.	Mg^{2+}浓度(mmol/L) Mg^{2+} concentration	退火温度(℃) Annealing temperature
A29	AJ509245	1.0	54
A107	AJ509287	1.2	58
A113	AJ509290	1.2	60
B124	AJ229016	1.5	55
A7	AJ229000	1.2	58
A14	AJ509239	1.7	58
A76	AJ509274	1.2	58
A88	AJ509283	1.5	55
Ap274	AJ509486	2.0	55
A35	AJ509251	1.0	57

2　结果与分析

2.1　样品重复类型聚类分析

经过对聚丙烯酰胺凝胶图谱的基因型判断发现，所有样品共有 76 个重复类型。首先利用 NTSYS-pc2.1 软件对 76 重复类型进行了初步聚类分析，得到图 1 所示的树状聚类图。从图上可以看出所有样品的遗传一致度在 0.61～1.00 之间，遗传相似性很高。结合样品采集地点进行分析发现，所有样品中有 4 个地区的样品出现严重分化：浙江地区样品分布于 A，C，D 组；四川地区样品分布于 A，B 组；甘肃地区分布于 A，B，C 组；云南地区样品分布于 A，B，C 组。

2.2　地理群体的遗传多态性分析

根据 NTSYS-pc2.1 软件分析得到的结果，浙江、四川、甘肃和云南四省的意蜂遗传分化明显，保守性较差。故将以上 4 个地区的意蜂样品去除

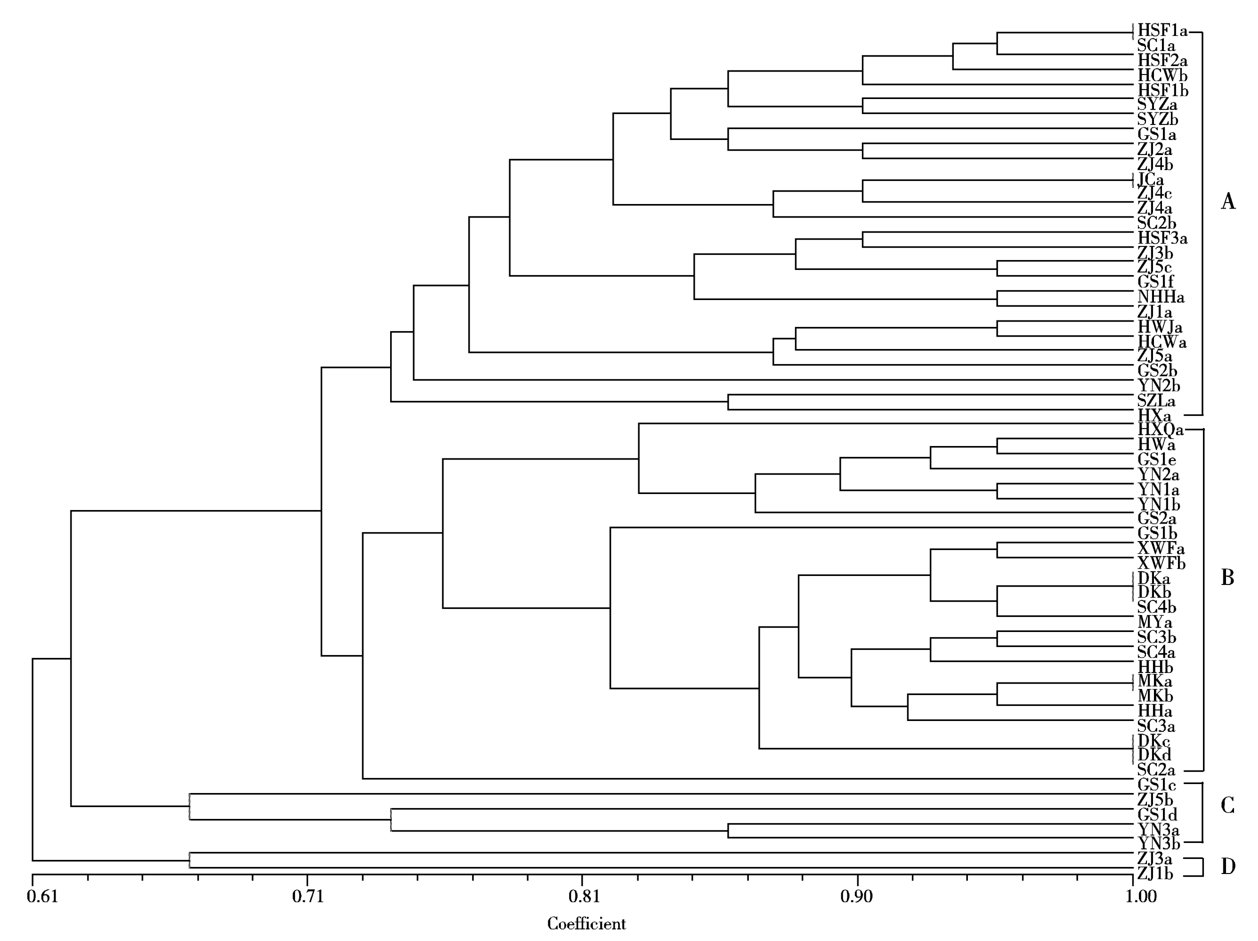


图 1　意大利蜜蜂种群基于 SSR 多态性的初步聚类分析树状图

Fig. 1　The elementary neighbor-joining tree based on SSR data of *Apis mellifera ligustica* populations

样品代码见表 1；下同。Refer to Table 1 for sample codes. The same below.

之后，以采集地点为单位进行划分，共得到 18 个地理群体(包括德国喀蜂和美国意蜂)，并利用 popGene32 软件和 NTSYS-pc2.1 软件对这些地理群体进行了遗传多态性分析，结果如下。

2.2.1 地理群体间的遗传一致度和遗传距离：采用 popGene32 软件对 18 个地理群体进行遗传一致度和遗传距离的计算，发现相互间的 Nei 氏遗传一致度(Nei, 1978)为 0.7005 ~ 0.9867(表 3)，遗传相似性较高。湖北武汉郊区一个蜂场的样品与美国意蜂样品之间的遗传一致度最低，为 0.7005；吉林长白山地区的样品与黑龙江哈尔滨地区的样品遗传一致度最高，为 0.9867；我国范围内意蜂群体间的遗传一致度在 0.7527 ~ 0.9867 之间，大部分样品之间的遗传一致度在 0.9 以上，占到了 75.98%；德国喀蜂与我国意蜂样品之间的遗传一致度在 0.7372 ~ 0.9763 之间，其中 0.9 以上的仅占到了 25%；美国意蜂与我国意蜂样品之间的遗传一致度在 0.7005 ~ 0.9575 之间，其中 0.9 以上的仅占到了 15.38%。

表 3 意大利蜜蜂保守地区样品的 Nei 氏遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between samples of *Apis mellifera ligustica* from conservative locations

	HSF1	HSF2	HSF3	HXQ	HWJ	HCW1	HCW2	HW	NHH	HX	SYZ	SZL	XWF	DK	MY	JC	LXM	HH
HSF1	****	0.9741	0.9370	0.9321	0.8985	0.9846	0.9728	0.9587	0.9029	0.8654	0.9432	0.9154	0.9066	0.9107	0.8663	0.9120	0.9421	0.9214
HSF2	0.0263	****	0.9405	0.9337	0.8766	0.9728	0.9544	0.9753	0.8832	0.8457	0.9166	0.9179	0.9491	0.9563	0.9252	0.9622	0.9664	0.9705
HSF3	0.0651	0.0614	****	0.8934	0.9194	0.9297	0.9282	0.9328	0.8867	0.8483	0.9530	0.8933	0.8646	0.8538	0.8241	0.8992	0.9195	0.9016
HXQ	0.0703	0.0686	0.1127	****	0.8698	0.9390	0.9410	0.9489	0.8394	0.7683	0.8786	0.8362	0.8253	0.8214	0.7726	0.8307	0.8601	0.8578
HWJ	0.1071	0.1317	0.0840	0.1395	****	0.9035	0.9424	0.8616	0.8406	0.7527	0.8847	0.8232	0.7520	0.7372	0.7005	0.7896	0.8041	0.7787
HCW1	0.0155	0.0275	0.0728	0.06309	0.1015	****	0.9636	0.9473	0.9021	0.8802	0.9401	0.9132	0.8895	0.8957	0.8503	0.8979	0.9270	0.9071
HCW2	0.0276	0.0467	0.0745	0.0608	0.0593	0.0371	****	0.9280	0.8664	0.8071	0.8919	0.8734	0.8657	0.8643	0.8250	0.8812	0.8959	0.8745
HW	0.0422	0.0250	0.0696	0.0525	0.1490	0.0541	0.0747	****	0.8885	0.8124	0.9197	0.8989	0.9220	0.9195	0.8746	0.9269	0.9465	0.9573
NHH	0.1022	0.1242	0.1203	0.1751	0.1737	0.1031	0.1435	0.1182	****	0.9205	0.9405	0.9657	0.8835	0.8079	0.7888	0.8422	0.8752	0.8531
HX	0.1446	0.1676	0.1645	0.2635	0.2842	0.1276	0.2143	0.2077	0.0829	****	0.9137	0.9203	0.8290	0.7892	0.7708	0.7985	0.8246	0.7994
SYZ	0.0585	0.0870	0.0481	0.1294	0.1225	0.0618	0.1144	0.0838	0.0613	0.0903	****	0.9277	0.8483	0.8267	0.7808	0.8503	0.9011	0.8698
SZL	0.0884	0.0856	0.1128	0.1788	0.1945	0.0907	0.1354	0.1066	0.0349	0.0831	0.0751	****	0.9353	0.8857	0.8453	0.8888	0.9120	0.9008
XWF	0.0981	0.0523	0.1454	0.1920	0.2850	0.1171	0.1442	0.0812	0.1239	0.1875	0.1646	0.0669	****	0.9763	0.9528	0.9728	0.9707	0.9748
DK	0.0935	0.0447	0.1580	0.1968	0.3048	0.1101	0.1924	0.0839	0.2134	0.2367	0.1904	0.1214	0.0240	****	0.9575	0.9718	0.9674	0.9791
MY	0.1435	0.0777	0.1935	0.2579	0.3559	0.1621	0.1924	0.1340	0.2372	0.2603	0.2474	0.1680	0.0484	0.0435	****	0.9792	0.9303	0.9632
JC	0.0922	0.0386	0.1063	0.1855	0.2363	0.1077	0.1265	0.0759	0.1717	0.2250	0.1622	0.1178	0.0275	0.0286	0.0210	****	0.9753	0.9867
LXM	0.0597	0.0342	0.0839	0.1508	0.2181	0.0758	0.1100	0.0550	0.1332	0.1929	0.1042	0.0921	0.0297	0.0331	0.0723	0.0250	****	0.9767
HH	0.0819	0.0299	0.1035	0.1534	0.2501	0.0975	0.1341	0.0437	0.1588	0.2238	0.1395	0.1045	0.0255	0.0212	0.0375	0.0134	0.0236	****

2.2.2 地理群体的聚类分析：利用表 3 所列各群体的 Nei 氏遗传距离进行 popGene32 的 UPGMA 聚类分析，得到如下遗传多态性聚类树状图(图 2)，所有样品共聚为 3 个大的分支，依次为：tg1，tg2 和 tg3。其中湖南、湖北和陕西地区的样品聚为一支，且聚合结果比较混乱，新疆、黑龙江、吉林、辽宁地区样品和美国意蜂、德国喀蜂聚为一支，河北、山东和宁夏样品聚为一支。其中，tg2 中黑龙江、吉林和辽宁样品聚为一个亚支，并再次和新疆样品聚于一个大的分支，四者两两之间遗传距离均在 0.18149 以内。

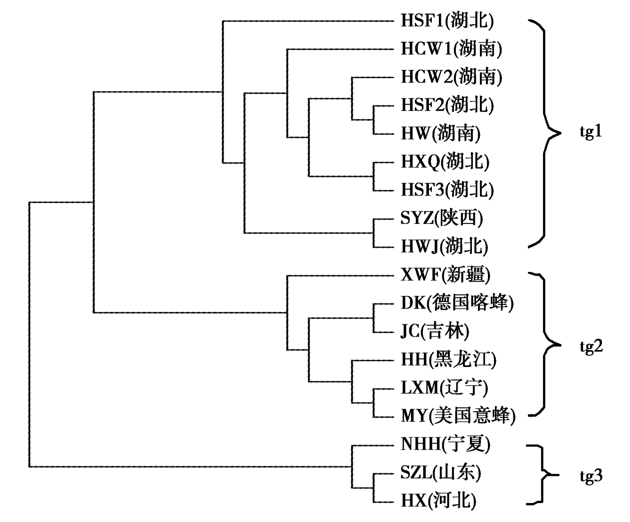


图 2 中国部分地区意大利蜜蜂遗传多态性聚类图

Fig. 2 The neighbor-joining tree of *Apis mellifera ligustica* in some locations throughout China

2.2.3 居群遗传多样性统计：利用 popGene32 软件对实验样品的 SSR 数据进行多样性统计，图 2 中 3 大分支以及实验样品的整体水平的观测等位基因数 *Na*、有效等位基因数 *Ne*、Nei 氏基因多样性 *H* 和 Shannon's 指数 *I* 见表 4。从表 4 中数据可见

tg1(样品主要来自湖南、湖北和陕西)的遗传多样性水平要比其他两个群体遗传多样性水平明显的高一些，tg2 与 tg3 的各项多样性指标比较接近。

2.2.4　居群间的 Nei 氏遗传变异分析：群体遗传分化分析表明，由 popGene32 软件聚类分析所得到的 3 个居群之间出现了一定程度的遗传分化(表 5)。根据总基因多样性 *Ht* 和群体内基因多样性 *Hs* 计算所得到 3 个居群间遗传分化系数 *Gst* 为 0.4231，再由 *Gst* 值推导出的 3 个群体间的基因流 *Nm* 较低，为 0.6818。

2.2.5　居群间的主成分分析：根据表 3 中各地理群体的遗传一致度数据进行 NTSYS-pc2.1 主成分分析，第一、第二、第三主成分所能解释的总变异度分别为 89.99%，4.14% 和 2.48%，累积变异度高达 96.61%，因此，它们完全可以作为主成分反映地理群体间的遗传多态性信息。根据 3 个主成分可将 18 个地理种群大致分为 3 个大类(图 3)，与 popGene32 软件的聚类分析结果(图 2)基本一致，但是各地理群体的遗传多态性信息更加细化，相互之间的分化状况更加直观。tg1 地理群体中湖南和湖北样品混聚为两个亚群，且完全与陕西样品分开；tg2 地理群体中黑龙江、吉林和辽宁样品聚在一起，并与新疆样品、德国喀蜂样品和美国意蜂样品两两分开；tg3 地理种群中的 3 组样品(河北、宁夏和山东)各自相互分开。

表 4　意大利蜜蜂各地理种群的遗传多样性统计

Table 4　Genetic diversity within geographical populations of *Apis mellifera ligustica*

群体 Colony	样本大小 Sample size	观测等位基因数 *Na* Observed number of alleles	有效等位基因 *Ne* Effective number of alleles	Nei 氏基因多样性 *H* Nei's gene diversity	Shannon's 指数 *I* Shannon's information index
tg1	33	1.9524 ±0.2182	1.2939 ±0.2838	0.1979 ±0.1471	0.3264 ±0.1973
tg2	32	1.7619 ±0.4364	1.1964 ±0.2938	0.1267 ±0.1583	0.2137 ±0.2238
tg3	11	1.6667 ±0.4830	1.2547 ±0.3204	0.1610 ±0.1747	0.2577 ±0.2480
整体水平 Total level	76	2	1.3263 ±0.3375	0.2049 ±0.1718	0.3309 ±0.2263

表 5　意大利蜜蜂 3 个地理群体 SSR 多样性 Nei 氏分析

Table 5　The Nei's analysis of gene diversity in subdivided populations

	总基因多样性 *Ht* Total gene diversity	群体内基因多样性 *Hs* Gene diversity within populations	基因分化系数 *Gst* Genetic differentiation coefficient	基因流 *Nm* Estimation of gene flow
平均值 Mean	0.2124	0.1225	0.4231	0.6818
标准差 *SD*	0.0298	0.0076		

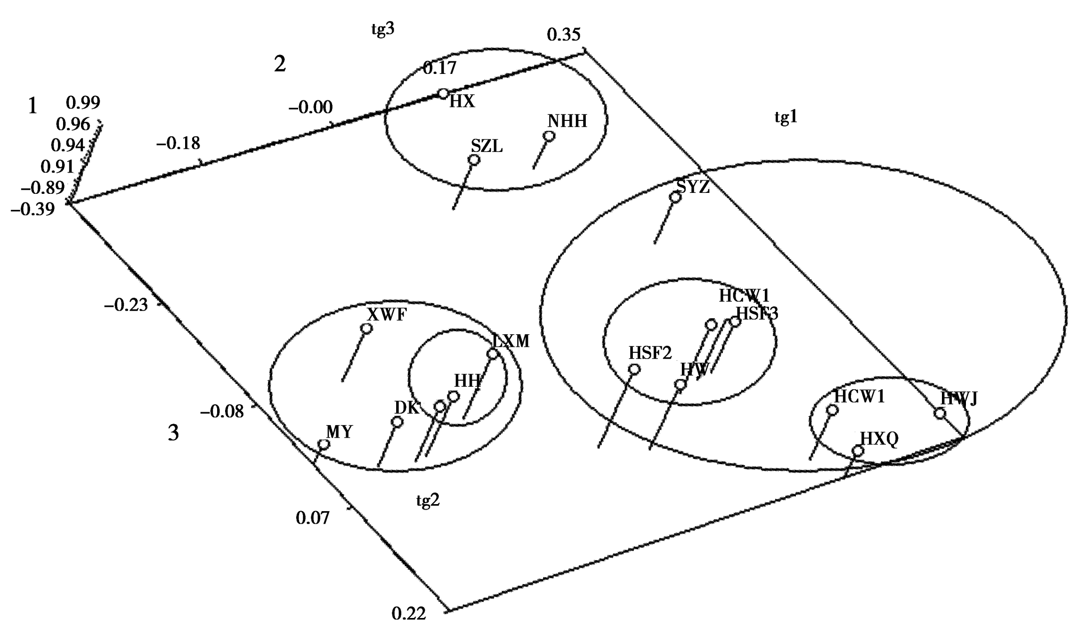


图 3　基于 SSR 的意大利蜜蜂各地理群体样品的主成分分析

Fig. 3　Principal component analysis based on SSR data among geographical colonies of *Apis mellifera*

3 讨论

微卫星技术作为一种常用的种群生物学研究手段，可提供高分辨率的遗传信息。微卫星标记一个显著的优点就是可以将遗传距离较近的分类单元区分开，例如同一亚种水平的不同生态型(Oall'olio *et al*., 2007)。本研究中所选用的样品包括意大利蜜蜂和喀尼阿兰蜂，根据前人的形态学和分子生物学研究结果，这两个蜂种同属于地理进化分支的 C 分支——北地中海分支，其亲缘关系很近(Rutter *et al*., 1978; Rutter, 1988; Cornuet *et al*., 1991; Garnery *et al*., 1993, 1995; Estoup *et al*., 1995)，而在本实验中利用多态性稳定的 8 对 SSR 引物可以将意蜂和喀蜂很好地分开，并得到其相互间的亲缘关系(遗传一致度为 0.9575，遗传距离为 0.0435)。本研究证明诸如 A107，A113，A7，A14，A76，A88，Ap274 和 A35 等 8 对多态性信息丰富的微卫星位点(Rowe *et al*., 1997; Franck *et al*., 2001)，完全可以用于检测意大利蜜蜂群体结构的变化情况。

通过对我国养蜂业较发达地区的意蜂进行 SSR 快速检测，发现在同样的遗传一致度范围内(0.61～1.00)，浙江、四川、甘肃和云南地区意蜂分化非常明显。从地理位置上看，以上 4 个地区多处南方或者生态环境多样性水平高的地区，这些地区一年四季蜜粉源较充足，是其他地区蜂群转地放养的集中地。例如，四川是我国蜜蜂种类最多的省份之一，全省饲养蜜蜂群势在 104 万群以上，且每年有 150 多万群外来蜜蜂在四川地区进行早春繁殖与采集油菜蜜源(郑吉良, 2003; 赵平, 2004)。在全国范围内，浙江蜜蜂的流动性最强，在我国各地主要蜜源的盛花期，具有浙江蜂场的踪影。甘肃是我国主要蜜库之一，每年有大量的外来蜂群进行商品蜜生产(赵平, 2004; 胡元强和胡福良, 2010)。云南多处热带和亚热带地区，四季如春，物种资源丰富。以上条件均利于增加蜜蜂各品种或生态型之间相互杂交的机会，故而造成以上 4 个地区的意蜂分化较严重，血统复杂等现象。浙江省自主培育成功的王浆高产意蜂品种一直受到全国科研工作者和养蜂人的高度关注，其育种方式多种多样，育种素材遍布全国各地种蜂场，这也是造成浙江地区意蜂杂化严重的主要因素之一(赵亚周等, 2009)。针对以上地区意蜂杂化严重的现象，我们认为有必要对这些地区意大利蜜蜂遗传分化情况进行全面而系统的研究，明确当地意蜂种质资源现状以及外来基因的渗入情况。

我国的养蜂业主要是由家庭作坊式发展而来，尤其是西部山区或者养蜂业欠发达地区，一直在沿用老式的蜜蜂饲养管理技术。虽然近年来意大利蜜蜂作为一种生产性能优良的蜂种得到了大规模推广，但是部分地区由于交通条件和成本消耗等问题，其转地饲养形式较少，多在当地进行定地或者小规模转地饲养，并且蜂种之间相互交流较少。久而久之，各地蜂群无论在生产性能方面，还是形态和基因方面都有或多或少的差异。基于 SSR 数据的聚类树状图(图 2)和主成分分析(图 3)可以看出，我国部分地区的意蜂具有明显的地域特色，保持有自身特有的分子生物学特征。实验样品群体的遗传多态性水平稍低，并存在一定的遗传分化(总的遗传多样性 *Ht* 为 0.2124，种群内遗传多样性 *Hs* 为 0.1225，遗传分化系数 *Gst* 为 0.4231)。同时基因流 *Nm* 为 0.6818(小于 1)，说明我国意大利蜜蜂在基因水平上存在一定程度的交流，具有遗传漂变引起种群进一步分化的风险(Slatkin, 1985, 1987)。因此，目前非常有必要对意大利蜜蜂品系进行严格保护。

聚类分析树状图(图 2)和主成分分析(图 3)显示，黑龙江、吉林、辽宁、新疆、德国的喀蜂和美国的意蜂样品聚为一大类，并且东北地区的样品与喀蜂样品的亲缘关系更近一些(同一分支)，新疆样品次之，与美国意蜂样品亲缘关系稍远。分析主要原因为，东北地区和新疆地区意蜂经过多年的饲养繁殖，其已经具有了当地的黑蜂血统。东北黑蜂和新疆黑蜂为 20 世纪初由俄罗斯传入我国，为喀尼阿兰蜂的后代，经过长期风土驯化和人工培育，其已经成为具有特殊形态指标和生物学特性的当地蜂种(龚一飞和张其康, 2000; 陈盛禄, 2001; 刘艳荷等, 2002)。由于黑蜂具有较强的御寒能力和采集力，其在当地常作为一种较好的育种素材与生产性能优良的意蜂品种进行杂交，以期促进当地养蜂业发展(刘艳荷和陈盛禄, 2001)。因此，东北三省和新疆的意蜂与喀蜂亲缘关系较近，主要是由于利用黑蜂繁育良种或者当地蜂群自然交尾所致。鉴于湖南及湖北样品在聚类分析时在一个大分支中出现混聚现象(图 2)，笔者认为原因主要在于当地国家级或者省级种蜂场较少有关。本实验样品采样过程中的调查发现，当地无论是定地还是转地饲养蜂群均存在从外地蜂场人工引种的历史记录，并且引种

来源遍及浙江、吉林和北京等多个地区。

总体来说，我国的意蜂品种与原种意大利蜜蜂相比较，其间的遗传一致度较高，为 0.61 以上，依然保持着其原种的典型基因特征，这种情况应当受到重视，并加以保护。鉴于浙江、甘肃、四川和云南等地区的意蜂血统杂化严重，将来的育种计划须谨慎进行，以保持我国意蜂相对独立的血统，防止种群内基因漂变现象的发生，使其更好地服务我国的养蜂业。东北黑蜂和新疆黑蜂是我国特有的黑蜂类型，具有诸多优良性状，应当谨慎地与生产性能较好的西方蜜蜂，尤其是意大利蜜蜂进行科学的杂交育种。

致谢　本研究中实验样本的采取承蒙浙江大学苏松坤教授、云南农业大学董霞教授、甘肃省养蜂研究所祁文忠副所长、新疆农业厅种蜂场蔡继红老师、陕西榆林市种蜂场刘新宇场长和宁夏固原市养蜂试验站王彪站长等老师和专家的热情帮助，实验过程中受到中国农业科学院蜜蜂研究所黄家兴老师耐心指导和帮助，匿名评审专家对本论文提出了宝贵的修改意见，在此一并表示诚挚的感谢。

参 考 文 献 (References)

Ball SL, Armstrong KF, 2008. Rapid, one-step DNA extraction for insect pest identification by using DNA barcodes. *Journal of Economic Entomology*, 101(2): 523 –532.

Chen SL, 2001. The Apicultural Science in China. China Agriculture Press, Beijing. 27 –30. [陈盛禄, 2001. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社. 27 –30]

Chen SL, Li JK, Zhong BX, Su SK, 2005. Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*). *Acta Genetica Sinica*, 32(10): 1 037 –1 044. [陈盛禄, 李建科, 钟伯雄, 苏松坤, 2005. 意大利蜜蜂产浆性状 10 个微卫星位点的遗传分析. 遗传学报, 32(10): 1 037 –1 044]

Cornuet JM, Garnery L, Solignac M, 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*, 128(2): 393 –403.

Estoup A, Garnery L, Soliganac M, Cornuet JM, 1995. Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) population: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation. *Genetics*, 140(2): 679 –695.

Estoup A, Solignac M, Harry M, Cornuet JM, 1993. Characterization of (GT) n and (CT) n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21(6): 1 427 –1 431.

Franck P, Gernery L, Loiseau A, Oldroyd BP, Hepburn HR, Solignac M, Cornuet JM, 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86(4): 420 –430.

Garnery L, Mosshine EH, Oldroyd BP, Cornuet JM, 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecolology*, 4(4): 465 –471.

Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet JM, 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49(11): 1 016 –1 021.

Gong YF, Zhang QK, 2000. Taxonomy and Evolution of Bee. Fujian Science and Technology Press, Fuzhou. 36 –43. [龚一飞, 张其康, 2000. 蜜蜂分类与进化. 福州: 福建科学技术出版社. 36 –43]

Hu YQ, Hu FL, 2010. Investigation report of organizational structure and humanistic quality of migratory apiaries from 2007 to 2008. *Apiculture of China*, 61(1): 15 – 17. [胡元强, 胡福良, 2010. 2007 ~2008 年转地蜂场组织结构和人文素质调查. 中国蜂业, 61(1): 36 –43]

Ji R, Xie BY, Yang GH, Li DM, 2003. From introduced species to invasive species – a case study on the Italian bee *Apis mellifera* L. *Chinese Journal of Ecology*, 22(5): 70 –73. [季荣, 谢宝瑜, 杨冠煌, 李典谟, 2003. 有意引入到外来入侵——以意大利蜜蜂 *Apis mellifera* L. 为例. 生态学杂志, 22(5): 70 –73]

Ji T, Chen J, Meng CL, Bao WB, Chen GH, 2007. Analyzing of genetic diversity of Pinghu royal jelly bee and Suwang No. 1 bee with microsatellite markers. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 34(11): 32 –34. [吉挺, 陈晶, 孟春玲, 包文斌, 陈国宏, 2007. 平湖浆蜂与苏王 1 号遗传多样性的微卫星 DNA 分析. 中国畜牧兽医, 34(11): 32 –34]

Ji T, Sun LX, Zhou B, Chen GH, 2003. Comparison among four lines of *A. m. ligustica* as morphological marker. *Journal of Bee*, (10): 3 –5. [吉挺, 孙亮先, 周斌, 陈国宏, 2003. 意大利蜜蜂 4 品系形态标记比较分析. 蜜蜂杂志, (10): 3 –5]

Ji WZ, Su B, 1996. Principles and Methodologies of Genetic Diversity Studies. Zhejiang Science and Technology Press, Hangzhou. 1 –3. [季维智, 宿兵, 1996. 遗传多样性研究的原理与方法. 杭州: 浙江科学技术出版社. 1 –3]

Jiang SL, Li BP, 2007. Species and ecological distribution of honey bee in different habitats in eastern Gansu. *Pratacultural Science*, 24(5): 89 –91. [姜双林, 李博平, 2007. 陇东地区不同生境下蜜蜂的种类及其生态分布. 草业科学, 24(5): 89 –91]

Liu YH, Chen SL, 2001. The combining ability and heterosis analysis of main economic properties in *Apis mellifera* L. *Journal of Shanghai Jiaotong University* (*Agricultural Science*), 19(3): 169 – 173. [刘艳荷, 陈盛禄, 2001. 西方蜜蜂(*Apis mellifera* L.)主要经济性状的配合力与杂种优势分析. 上海交通大学学报(农业科学版), 19(3): 169 –173]

Liu YH, Chen SL, Tong FD, Zhang CX, 2002. Genetic variability of MDHⅡgene in six subspecies of *Apis mellifera*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 188 –192. [刘艳荷, 陈盛禄, 童富淡, 张传溪, 2001. 西方蜜蜂六个亚种苹果酸脱氢酶Ⅱ基因的遗传差异. 昆虫学报, 45(2): 188 –192]

Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 145 –163.

Oall' olio R, Marino A, Lodesani M, Moritz RFA, 2007. Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on

microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie*, 38(2): 207 -217.

Peng WJ, Luo QH, An JD, Huang JX, Guo J, 2009. Analysis of genetic relationships of northeastern black bee (*Apis mellifera* ssp.) in China. *Scienitia Agricultura Sinica*, 42(4): 1 421 -1 502. [彭文君, 罗其花, 安建东, 黄家兴, 郭军, 2009. 东北黑蜂(*Apis mellifera* ssp.)亲缘关系的分析. 中国农业科学, 42(4): 1 421 -1 502]

Rowe DJ, Rinderer TE, Stelzer JA, Oldroyd BP, Crozier RH, 1997. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 44(2): 85 -93.

Ruttner F, 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag Press, Berlin. 1 -6.

Ruttner F, Tassencourt L, Louveaux J, 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9(4): 363 -381.

Slatkin M, 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 293 -430.

Slatkin M, 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4 803): 787 -792.

Solignac M, Vautrin D, Baudry E, Mougel F, Loiseau A, Cornuet JM, 2004. A microsatellite-based linkage map of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Genetics*, 167(1): 253 -262.

Solignac M, Vautrin D, Loiseau A, Mougel F, Baudry E, Estou PA, Gemery L, Haberl M, Cornuet JM, 2003. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes*, 3(2): 307 -311.

Sun LX, Ji T, Zhou B, Chen GH, Yuan JY, Huang ZY, 2003. Screening genetic markers of important agricultural traits of *Apis mellifera ligustica* by using random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Apiculture of China*, 54(6): 4 -8. [孙亮先, 吉挺, 周斌, 陈国宏, 袁建英, 黄周英, 2003. 以随机扩增多态性DNA(RAPD)技术筛选意大利蜜蜂重要农艺性状遗传标记. 中国蜂业, 54(6): 4 -8]

Sun LX, Xu BH, 2004. Analysis of RAPD genetic markers in four lines of *Apis mellifera ligustica*. *Journal of Shandong Agricultural University* (*National Science Edition*), 35(3): 335 -338. [孙亮先, 胥保华, 2004. 四个意大利蜜蜂品系 RAPD 遗传标记的分析. 山东农业大学学报(自然科学版), 35(3): 335 -338]

Susnik S, Kozmus P, Poklukar J, Meglic V, 2004. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*, 35(6): 623 -636.

Wang FH, Yang F, Geng JH, Xu XL, 2007. Conservation and utilization of the Chinese honeybee *Apis cerana* in Beijing. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(6): 923 -927. [王凤鹤, 杨甫, 耿金虎, 徐希莲, 2007. 北京中华蜜蜂的保护. 昆虫知识, 44(6): 923 -927]

Wu LM, Peng WJ, Ji T, Liu FX, 2005. Comparison between three species of honeybee using RAPD markers. *Apiculture of China*, 56(4): 9 -10. [吴黎明, 彭文君, 吉挺, 刘福秀, 2005. 三个蜂种的 RAPD 标记比较分析. 中国蜂业, 56(4): 9 -10]

Yang GH, 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 401 -406. [杨冠煌, 2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. 昆虫学报, 48(3): 401 -406]

Yang GH, 2009. The effect of *Apis cerana cerana* on forest ecosystem. *Apiculture of China*, 60(4): 5 -10. [杨冠煌, 2009. 中华蜜蜂在我国森林生态系统中的作用. 中国蜂业, 60(4): 5 -10]

Yu LS, Han SM, 2003. Effect of habitat and interspecific competition on *Apis cerana cerana* colony distribution. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 14(4): 553 -556. [余林生, 韩胜明, 2003. 栖息环境和种间竞争对中华蜜蜂群体分布的影响. 应用生态学报, 14(4): 553 -556]

Yu LS, Zou YD, Cao YF, Bi SD, Wu HC, Ding J, Xie WF, 2008. Comparative study on the niches of *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Acta Ecologica Sinica*, 28(9): 4 575 -4 581. [余林生, 邹运鼎, 曹义锋, 毕守东, 巫厚长, 丁建, 解文飞, 2008. 意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)与中华蜜蜂(*Apis cerana ceraca*)的生态位比较. 生态学报, 28(9): 4 575 - 4 581]

Zhao P, 2004. Accelerating the quality of bee product to improve the bee keeping development in Sichuan. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 31(8): 8 -9. [赵平, 2004. 加强蜂产品质量促进四川蜂业健康发展. 四川畜牧兽医, 31(8): 8 -9]

Zhao YZ, Hang JX, An JD, Peng WJ, Gao ZH, 2009. The influencing factors and primary research methods on genetic diversity of the honeybee. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(5): 690 -696. [赵亚周, 黄家兴, 安建东, 彭文君, 高志鸿, 2009. 蜜蜂遗传多态性的影响因素及主要研究方法. 昆虫知识, 46(5): 690 -696]

Zheng JL, 2003. Suggestion for the bee-keeping in the basin of Sichuan. *Journal of Bee*, (1): 32 -33. [郑吉良, 2003. 四川盆地蜂群春繁建议. 蜜蜂杂志, (1): 32 -33]

(责任编辑: 袁德成)